

A.R. Fadila, Suminto, Subandiyono, D. Chilmawati/Jurnal Sains Akuakultur Tropis : 5(2021)2:147- 158.
eISSN:2621-0525



Jurnal Sains Akuakultur Tropis

Departemen Akuakultur

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan - Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang 50275

Telp. (024) 7474698, Fax.: (024) 7474698

Email: sainsakuakulturtropis@gmail.com, sainsakuakulturtropis@undip.ac.id

PENGARUH RASIO N:P DALAM MEDIA KULTUR TERHADAP POLA PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN PROTEIN *Thalassiosira* sp.

The Effect of N:P Ratio in The Culture Medium on Growth Pattern and Protein Content of Thalassiosira sp.

Abdur Rasyid Fadila, Suminto*), Subandiyono, Diana Chilmawati

Departemen Akuakultur

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto SH, Tembalang, Semarang – 50275

* Corresponding author: Suminto57@gmail.com

ABSTRAK

Thalassiosira sp. merupakan salah satu spesies diatom laut yang digunakan untuk pakan alami larva udang. Pertumbuhan diatom ini dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah ketersediaan dan proporsi nutrisi dalam media. Nitrogen dan fosfor merupakan makronutrien yang membatasi pertumbuhan diatom dan produktivitas primer. Nitrogen merupakan nutrisi utama untuk pertumbuhan diatom dan fosfor berperan dalam metabolisme sel. Nutrien N dan P dengan rasio tertentu diperlukan untuk mendukung pertumbuhan diatom secara optimum. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh rasio N:P terhadap pola pertumbuhan dan kandungan protein *Thalassiosira* sp. Penelitian ini dilaksanakan di PT. Matahari Cipta Sentosa, Yogyakarta pada bulan Agustus hingga September 2020. Metode eksperimental penelitian ini adalah dengan menerapkan 5 perlakuan dan 4 ulangan, yaitu masing-masing perlakuan A (tanpa N dan P), B (rasio N:P=4:1), C (rasio N:P=8:1), D (rasio N:P=12:1) dan E (rasio N:P=16:1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio N:P berpengaruh nyata ($P \leq 0,05$) terhadap pola pertumbuhan *Thalassiosira* sp. Rasio N:P juga memberikan pengaruh terhadap kandungan protein *Thalassiosira* sp. Rasio 12:1 dan 16:1 menghasilkan pola pertumbuhan terbaik yaitu nilai waktu *lag phase* $-1,756 \pm 0,048$ hingga $-1,712 \pm 0,041$ hari; laju pertumbuhan $0,610 \pm 0,006$ hingga $0,623 \pm 0,011$ hari; kepadatan sel maksimum $5,215 \pm 0,012$ hingga $5,247 \pm 0,022$ log sel/ml dan kepadatan sel akhir $4,700 \pm 0,048$ hingga $4,805 \pm 0,032$ log sel/ml. Rasio 4:1 menghasilkan nilai kandungan protein tertinggi sebesar 42,11 %.

Kata kunci: *Thalassiosira*, pakan alami, pola pertumbuhan, kandungan protein, rasio N:P

ABSTRACT

Thalassiosira sp. is one of marine diatom species used for live food for shrimp larvae. This diatom growth is affected by many factors, one of them is nutrients availabilities and proportion in the medium. Nitrogen and phosphorus are macronutrient that limit diatom growth and primary productivity. Nitrogen is the main nutrient for the growth of diatoms and phosphorus which plays a role in cell metabolism. N and P nutrients with certain ratio are needed for support optimum growth of microalgae. This research is aiming to examine the effect of the N:P ratio on growth pattern and protein content and also determine the best N:P ratio on growth pattern and protein content of *Thalassiosira* sp. This research

was conducted in PT. Matahari Cipta Sentosa Yogyakarta on august until september 2020. The experimental method of this research is to apply 5 treatments and 4 replications, namely each treatments A (without N and P), B (ratio N:P=4:1), C (ratio N:P=8:1), D (ratio N:P 12:1) and E (ratio N:P 16:1). The result showed that the N:P ratio had a significant effect ($P \leq 0,05$) on the growth pattern *Thalassiosira* sp. N:P ratio also effect on protein content *Thalassiosira* sp. Ratio N:P=12:1 and 16:1 is the best N:P ratio in research which result in phase lag time $-1,756 \pm 0,048$ until $-1,712 \pm 0,041$ days, growth rate $0,610 \pm 0,006$ until $0,623 \pm 0,011$ days, maximum cell density $5,215 \pm 0,012$ until $5,247 \pm 0,022$ log cell/ml, final cell density $4,700 \pm 0,048$ until $4,805 \pm 0,032$ log cell/ml. Ratio N:P=4:1 resulted protein value content of 42.3%.

Key word: *Thalassiosira*, live food, growth pattern, protein content, N:P ratio

***Corresponding author :** suminto57@gmail.com

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan organisme fotosintetik akuatik yang memanfaatkan sinar matahari dan karbondioksida untuk menghasilkan biomassa. Produk-produk mikroalga diaplikasikan pada berbagai bidang seperti farmasi, produksi biofuel, kosmetik dan akuakultur (Marchetti *et al.*, 2012). Salah satu jenis dari mikroalga yaitu diatom. Diatom memiliki ciri berupa sel dinding yang tersusun dari silika (Nugroho, 2019). Diatom dalam bidang akuakultur dimanfaatkan sebagai pakan alami larva ikan, udang dan kerang. Salah satu jenis diatom yang digunakan sebagai pakan alami larva udang yaitu *Thalassiosira* sp. (Panjaitan *et al.*, 2015) Kandungan gizi yang terkandung dalam *Thalassiosira weissflogii* terdiri dari protein 28%, lipid 22% dan karbohidrat 23%, dari bobot kering (Emerson, 1980). *Thalassiosira* sp. mengandung asam lemak tak jenuh yang terdiri dari total *Mono Unsaturated Fatty Acid* (MUFA) sebesar $5,9 \pm 8,56\%$ dan total *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) sebesar $10,51 \pm 4,18\%$ (Widianingsih *et al.*, 2013). Pakan alami ini masih belum bisa digantikan oleh pakan buatan sehingga diperlukan adanya proses kultur untuk menghasilkan *Thalassiosira* sp. dalam jumlah yang banyak sebagai pakan larva udang.

Pertumbuhan *Thalassiosira* sp. dipengaruhi oleh faktor eksternal. Beberapa faktor eksternal yang memengaruhi pertumbuhan fitoplankton yaitu terdiri dari pH, suhu, nutrisi dalam media kultur, cahaya atau lama pencahayaan (Nurfalaa *et al.*, 2016). Nitrogen dan fosfor merupakan makronutrien yang membatasi pertumbuhan fitoplankton dan produktivitas primer (Downing, 1997; Sisi *et al.*, 2010). Nitrogen dalam bentuk nitrat adalah nutrisi utama yang digunakan oleh fitoplankton untuk pertumbuhan (Risamasu dan Prayitno, 2011). Fosfor berperan pada metabolisme sel. Fosfor digunakan saat peredaran energi, transfer energi serta perangsang reaksi dalam metabolisme sel (Dyhrman, 2016).

Banyak studi yang membahas pengaruh rasio N:P terhadap pertumbuhan mikroalga (Klausmeier *et al.*, 2004; Rasdi dan Qin 2014 dan Yang *et al.*, 2014). Rasio N:P dimanipulasi dengan proporsi berbeda dari pengurangan atau penambahan N dan P dalam media walne untuk mencapai rasio N:P yang akan diteliti. Belum banyak informasi mengenai rasio N:P terhadap pertumbuhan *Thalassiosira* sp. sehingga diperlukan penelitian mengenai hal ini. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengkaji pengaruh rasio N:P pada media walne terhadap pola pertumbuhan dan kandungan protein serta mengetahui rasio N:P terbaik untuk pola pertumbuhan dan kandungan protein *Thalassiosira* sp.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu toples 5 liter sebanyak 20 buah sebagai wadah kultur, *erlenmeyer* 500 ml (iwaki) sebagai wadah dari nitrogen/fosfor dan media kultur, *tube lamp* 36 watt (philips), rak kultur sebagai tempat meletakkan wadah kultur, blower, *autoclave*, selang aerasi, mikroskop (olympus), *haemocytometer* (assistent), refraktometer (atago) dan pH meter (thermo scientific).

Inokulan *Thalassiosira* sp. yang digunakan berasal dari stok biakan murni PT. Matahari Cipta Sentosa Yogyakarta. Media kultur walne yang terdiri dari NaNO_3 , H_3BO_3 , Na_2EDTA , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_8\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SiO_3 , thiamine dan cyanocobalamin (Walne 1970 dalam Andersen, 2004). Air laut yang digunakan untuk kultur *Thalassiosira* sp. didapatkan setelah melalui proses sterilisasi menggunakan klorin dengan perbandingan klorin dan air laut 0,06 ml/L serta sebelum digunakan kultur dinetralkan dengan menggunakan Na-thiosulfat dengan dosis 0,02 ml/L air laut (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian eksperimental. Metode eksperimental

adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lainnya dalam kondisi yang terkendali (Sugiyono, 2011). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Alga, PT. Matahari Cipta Sentosa, Yogyakarta pada bulan Agustus-September tahun 2020.

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan dengan susunan sebagai berikut:

Perlakuan A :(tanpa N dan P)

Perlakuan B :(rasio N:P=4:1 dengan 0,580 mol/l NaNO_3 :0,145 mol/l NaH_2PO_4)

Perlakuan C :(rasio N:P=8:1 dengan 1,176 mol/l NaNO_3 :0,145 mol/l NaH_2PO_4) (rasio pada media walne)

Perlakuan D :(rasio N:P=12:1 dengan 1,740 mol/l NaNO_3 :0,145 mol/l NaH_2PO_4)

Perlakuan E :(rasio N:P=16:1 dengan 2,320 mol/l NaNO_3 :0,145 mol/l NaH_2PO_4)

Media walne digunakan sebagai rumus dasar N:P untuk menentukan rasio N:P lainnya. Media walne terdiri dari NaNO_3 , H_3BO_3 , Na_2EDTA , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_8\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SiO_3 , Thiamine dan cyanocobalamin (Walne 1970 dalam Andersen, 2004). Rasio N:P pada media walne diperoleh 8:1 (1,176 mol/l NaNO_3 :0,145 mol/l NaH_2PO_4). Rasio N:P yang lainnya dilakukan manipulasi dengan pengurangan atau penambahan N dan P sehingga diperoleh rasio N:P yang akan diteliti.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi alat dan bahan

Proses sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi media kultur dilakukan proses *autoclave* dengan suhu 115°C selama 30 menit (Trikuti *et al.*, 2016). Air laut disterilisasi menggunakan klorin dengan perbandingan klorin dan air laut 0,06 ml/L serta sebelum digunakan kultur dinetralkan dengan menggunakan Na-thiosulfat dengan dosis 0,02 ml/L air laut (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Pembuatan media kultur

Menurut Walne (1970) dalam Andersen (2004), bahwa komposisi dalam media Walne terdiri dari media Walne, *trace element* dan vitamin serta sodium metasilikat (Na_2SiO_3) 40 mg/l khusus untuk diatom. Pembuatan media kultur untuk kultur jenis diatom diawali dengan mencampurkan bahan media kultur kedalam 1 L aquades yang sudah disaring dan dilakukan sterilisasi menggunakan *autoclave*. Langkah berikutnya setelah pendinginan ditambahkan larutan nutrisi berupa 1 ml *trace element* dan 100 μL larutan vitamin. Penjelasan pembuatan larutan *trace element* dan larutan vitamin ada setelah pembuatan media kultur. Komposisi media Walne dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Media Walne

No.	Nutrisi	Jumlah
1.	NaNO_3	100 gram
2.	H_3BO_3	33,6 gram
3.	Na_2EDTA	45 gram
4.	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 gram
5.	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,3 gram
6.	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,36 gram
7.	<i>Trace element</i>	1 ml/L
8.	Vitamin	100 μL

Penelitian ini menggunakan media Walne untuk kultivasi *Thalassiosira* sp. dengan penambahan *trace element*. Komposisi *trace element* pada media Walne dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi *Trace Element* dalam Media Walne

No.	Nutrisi	Jumlah
1.	ZnCl_2	21 gram
2.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 gram

3.	(NH ₄) ₈ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	9 gram
4.	CuSO ₄ .5H ₂ O	20 gram
5.	Aquades	100 ml

Komposisi vitamin dalam media Walne yaitu Thiamine (vitamin B₁) 1 gram dan Cyanocobalamin (vitamin B₁₂) 50 mg. Pembuatan larutan vitamin dimulai dengan sterilisasi aquades 950 ml dengan *autoclave*. Langkah berikutnya melarutkan Thiamine dan Cyanocobalamin ke dalam 950 ml aquades. Larutan vitamin disimpan dalam *freezer*.

Komposisi nutrisi dalam media kultur yang digunakan pada masing-masing perlakuan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3. Komposisi *Trace element* sama untuk semua perlakuan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Nutrien dalam Media Kultur

No.	Komposisi nutrisi dalam media kultur	Perlakuan				
		A	B	C	D	E
1.	NaNO ₃ (gram)	-	49,3	100	147,9	197,2
2.	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (gram)	-	20	20	20	20
3.	Na ₂ EDTA (gram)	45	45	45	45	45
4.	H ₃ BO ₃ (gram)	33,6	33,6	33,6	33,6	33,6
5.	FeCl ₃ .6H ₂ O (gram)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
6.	MnCl ₂ .4H ₂ O (gram)	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
7.	<i>Trace element</i> (ml)	1	1	1	1	1
8.	Vitamin (μL)	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL

Kultur *Thalassiosira* sp.

Kultur *Thalassiosira* sp. dilakukan pada wadah toples volume 5 liter. Kultur pada penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali kultur yang sama yaitu kultur pertama selama 14 hari untuk mendapatkan pola pertumbuhan dan kultur kedua selama 2 hari untuk mendapatkan sampel untuk uji kandungan protein kasar. Kultur kedua dilakukan hingga sel *Thalassiosira* sp. mengalami puncak kepadatan dan masuk fase stasioner (Mansour *et al.*, 2005). Kultur dilakukan dengan urutan sebagai berikut pertama mempersiapkan alat dan bahan yang sudah steril. Langkah berikutnya air laut steril sebanyak 4 liter dimasukkan pada setiap wadah toples. Media kultur, NaNO₃ serta NaH₂PO₄ sesuai perlakuan dimasukkan ke toples dengan dosis yaitu 1 ml per 1 L air laut. Langkah berikutnya memasukkan inokulan *Thalassiosira* sp. dengan kepadatan 1×10⁴ sel/ml ke dalam toples sebanyak 400 ml. Perbandingan inokulan dengan media air laut steril yaitu 100 ml inokulan/1 liter air laut (Rasdi dan Qin, 2014). Aerasi ditambahkan pada setiap toples. Salinitas yang digunakan pada kultur ini yaitu 29-30 ppt dan pH 7,8-8,2 (Qingtian dan Guikum, 2011). Perhitungan kepadatan dilakukan dengan mengambil sampel 1 ml dan diletakkan pada *haemocytometer* kemudian diamati dibawah mikroskop. Perhitungan ini dilakukan setiap hari hingga 14 hari masa kultur.

Pengumpulan data

Data yang dikumpulkan yaitu data pola pertumbuhan yang meliputi waktu *lag phase*, laju pertumbuhan, kepadatan sel maksimum dan kepadatan sel akhir. Data kandungan protein menggunakan metode semimikro kjeldahl dan selama penelitian kualitas air dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali yaitu awal, tengah dan akhir penelitian.

Kepadatan sel *Thalassiosira* sp.

Kepadatan harian sel *Thalassiosira* sp. dihitung dengan menggunakan rumus yang berasal dari referensi Suminto (2005), menggunakan kotak kecil 400 *haemocytometer* yang berukuran 1 mm² dengan kedalaman 0,1 mm. Rumus yang digunakan yaitu:

$$\text{Volume kotak 400 haemocytometer} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \\ = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ ml}$$

Volume 400 kotak *Haemocytometer* 0,0001 ml, sehingga rumus kepadatan yang digunakan yaitu:

$$\text{kepadatan sel (P)} = \frac{\text{jumlah sel pada kotak 400 Haemocytometer}}{\text{volume Haemocytometer}}$$

$$P = \frac{N}{10^{-4}} \text{ sel/mL}$$

$$P = N \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

dimana:

P = kepadatan sel (sel/mL)

N = jumlah sel yang terhitung pada 400 kotak kecil *Haemocytometer*

Waktu lag phase *Thalassiosira* sp.

Perhitungan waktu *lag phase* adalah dengan cara mengitung regresi linear selama fase eksponensial (Suminto dan Hirayama, 1996), dengan rumus yaitu:

$$Y = A + B$$

dimana:

Y = logaritma kepadatan sel

A = waktu *lag phase* (hari)

B = konstanta

Waktu *lag phase* (A) dihitung dengan Y = kepadatan kultur awal, sehingga rumus tersebut kemudian digunakan untuk menghitung A menjadi:

$$Y = Ak + B$$

dimana:

Y = logaritma kepadatan sel pada hari ke-0

A = waktu *lag phase*

K = konstanta laju pertumbuhan

B = konstanta hasil perhitungan regresi linear selama fase eksponensial

Laju pertumbuhan *Thalassiosira* sp.

Laju pertumbuhan *Thalassiosira* sp. dihitung menggunakan rumus yang pernah digunakan dalam penelitian Fogg (1965), yaitu:

$$K = \frac{\log W_t - \log W_0}{\Delta t}$$

dimana:

K = konstanta pertumbuhan spesifik

W_t = jumlah sel pada hari ke- t

W₀ = jumlah sel pada hari ke-0

Δt = waktu dari 0 – t (hari)

Kualitas air

Data kualitas air diukur 3 kali selama penelitian yaitu awal, tengah dan akhir kultur. Variabel kualitas air yang diukur yaitu salinitas, pH dan suhu. Alat ukur kualitas air yang digunakan yaitu refrakometer dan pH meter.

Analisis Data

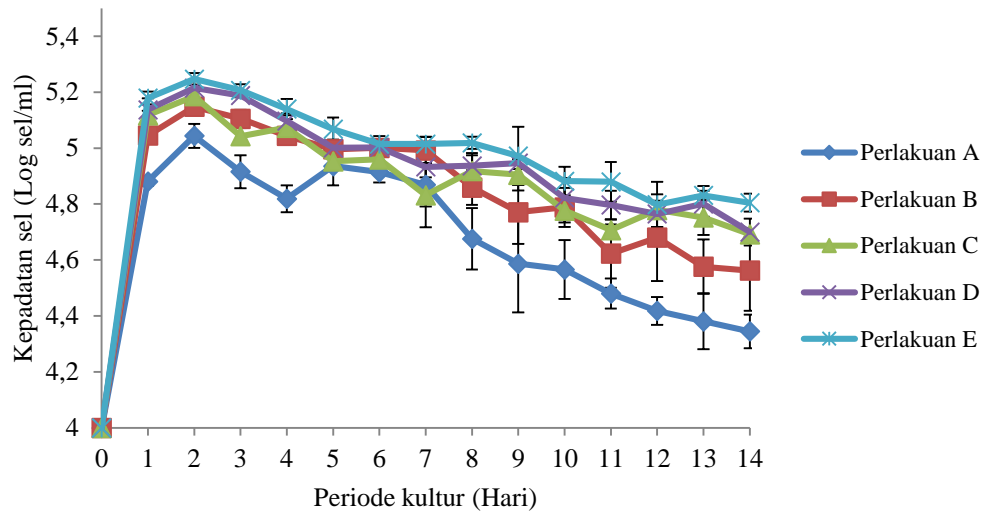
Data yang dianalisis secara statistik meliputi waktu *lag phase*, laju pertumbuhan, kepadatan sel maksimum dan kepadatan sel akhir *Thalassiosira* sp. Data dilakukan uji analisis ragam untuk mengetahui pengaruh rasio N:P terhadap pola pertumbuhan *Thalassiosira* sp. Apabila hasil menunjukkan pengaruh nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dan perlakuan yang memberikan hasil terbaik. Data kandungan protein dan kualitas air dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pola pertumbuhan *Thalassiosira* sp.

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh perbedaan rasio N:P pada media walne terhadap pola pertumbuhan dan kandungan protein *Thalassiosira* sp., diperoleh grafik pola pertumbuhan yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pola Pertumbuhan *Thalassiosira* sp. Berdasarkan Perbedaan Rasio N:P dalam Media Walne.

Berdasarkan garfik dapat disimpulkan bahwa untuk semua perlakuan mengalami pola pertumbuhan yang ditandai dengan waktu *lag phase*, laju pertumbuhan, kepadatan sel maksimum dan kepadatan sel akhir. Data kepadatan sel dari tertinggi hingga terendah berturut-turut yaitu perlakuan E, perlakuan D, perlakuan C, perlakuan B dan perlakuan A.

Data pola pertumbuhan *Thalassiosira* sp. yang meliputi waktu *lag phase*, laju pertumbuhan, kepadatan sel maksimum dan kepadatan sel akhir. Data pola pertumbuhan selama penelitian tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Waktu *Lag Phase*, Laju Pertumbuhan, Kepadatan Sel Maksimum dan Kepadatan Sel Akhir *Thalassiosira* sp. Berdasarkan Perbedaan Rasio N:P pada Media Walne

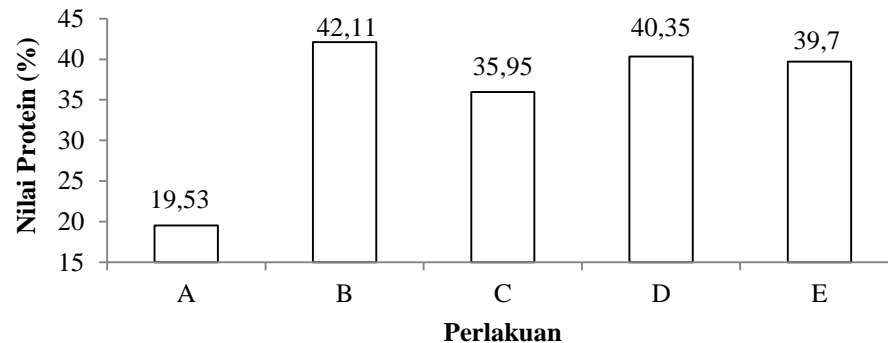
Perlakuan	Data Pola Pertumbuhan			
	Waktu fase lag (hari)	Laju pertumbuhan (log sel/ml perhari)	Kepadatan sel maksimum (log sel/ml)	Kepadatan sel akhir (log sel/ml)
A	-2,045 ± 0,028 ^a	0,522 ± 0,022 ^a	5,044 ± 0,043 ^a	4,345 ± 0,060 ^a
B	-1,858 ± 0,035 ^b	0,574 ± 0,010 ^b	5,148 ± 0,020 ^b	4,562 ± 0,114 ^b
C	-1,799 ± 0,070 ^{bc}	0,593 ± 0,012 ^{bc}	5,186 ± 0,025 ^{bc}	4,692 ± 0,023 ^c
D	-1,756 ± 0,048 ^{cd}	0,610 ± 0,006 ^{cd}	5,215 ± 0,012 ^{cd}	4,700 ± 0,048 ^{cd}
E	-1,712 ± 0,041 ^d	0,623 ± 0,011 ^d	5,247 ± 0,022 ^d	4,805 ± 0,032 ^d

Keterangan: tanda *superscript* yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Berdasarkan Tabel 1. diketahui bahwa data pola pertumbuhan tertinggi pada perlakuan E dengan waktu *lag phase* -1,712 ± 0,041^d hari, laju pertumbuhan 0,623 ± 0,011^d log sel/ml perhari, kepadatan sel maksimum 5,247 ± 0,022^d log sel/ml dan kepadatan sel akhir 4,805 ± 0,032^d log sel/ml. Perlakuan A memiliki data pola pertumbuhan terendah dengan waktu *lag phase* -2,045 ± 0,028^a hari, laju pertumbuhan 0,522 ± 0,022^a log sel/ml perhari, kepadatan sel maksimum 5,044 ± 0,043^a log sel/ml dan kepadatan sel akhir 4,345 ± 0,060^a log sel/ml.

Kandungan protein *Thalassiosira* sp.

Kandungan protein *Thalassiosira* sp. tersaji pada Gambar 2.



Gambar 2. Nilai protein sel *Thalassiosira* sp.

Berdasarkan Gambar 2. diketahui bahwa nilai protein *Thalassiosira* sp. dari tertinggi ke terendah berturut-turut yaitu perlakuan B 42,3%, perlakuan D 40,35%, perlakuan E 39,70%, perlakuan C 35,95% dan perlakuan A 19,53%.

Kualitas air dan intensitas cahaya kultur *Thalassiosira* sp.

Nilai kualitas air yang terdiri dari suhu, pH, salinitas dan intensitas cahaya tersaji pada Tabel 5.

Tabel 5. Kualitas Air dan Intensitas Cahaya Kultur *Thalassiosira* sp.

Perlakuan	Kualitas air dan intensitas cahaya			
	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Salinitas (ppt)	Intensitas cahaya (lux)
A	25,1 - 27,7	7,9 - 8,5	30 - 34	7500
B	25,2 - 27,4	8 - 9,6	30 - 34	7500
C	25,3 - 27,6	7,9 - 9,5	30 - 34	7500
D	25,3 - 27,3	8 - 9,6	30 - 33	7500
E	25,1 - 26,9	8 - 9,6	30 - 34	7500
Kelayakan	10 - 32,5 ^{a)}	7 - 9 ^{b)}	12 - 41 ^{b)}	1000-10000 ^{c)}

Keterangan :

^{a)} : Boyd, 2013;

^{b)} : FAO, 1996;

^{c)} : Simionato *et al.*, 2013.

Berdasarkan Tabel 2. diketahui bahwa intensitas cahaya dan nilai kualitas air selama penelitian sudah sesuai untuk pertumbuhan *Thalassiosira* sp.

PEMBAHASAN

Pola pertumbuhan *Thalassiosira* sp.

Pertumbuhan ditandai dengan kelimpahan sel yang mengalami peningkatan. Mikroalga bereproduksi dengan cara pembelahan sel (Ma'rufatin, 2016). Hasil penelitian ini terjadi pertumbuhan alga yang meningkat dari rasio N:P 0:0 hingga 16:0. Pertumbuhan diatom dengan kepadatan tertinggi terjadi pada perlakuan D dan E dengan kepadatan sel $1,6 \times 10^5$ hingga $1,7 \times 10^5$ sel/ml dibanding dengan rasio N:P yang lainnya. Hasil ini hampir sama dengan penelitian Rasdi dan Qin (2014) dimana pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* dan *Tisochyris lutea* mengalami peningkatan jumlah sel dari rasio N:P 5:1 hingga 20:1, tetapi pada rasio 30:1 hingga 120:1 terdapat jumlah sel yang lebih kecil. Hasil penelitian sebelumnya Qingtian dan Guikum (2011) bahwa pertumbuhan optimal sel *Thalassiosira* sp. terjadi pada rasio N:P 20:1 dengan sumber nitrogen dari urea dan pada rasio N:P 30:1 dengan ammonium sebagai sumber nitrogennya. Penelitian lain oleh Razaghi *et al.* (2014), bahwa mikroalga *Porphyridium cruentum* dapat tumbuh optimal pada rasio N:P 35-50:1. Hasil beberapa penelitian diatas menunjukkan bahwa pertumbuhan berbagai spesies diatom dipengaruhi oleh kisaran rasio N:P yang berbeda. Menurut penelitian Sisi *et al.* (2010), bahwa nitrogen dan fosfor merupakan nutrisi utama untuk pertumbuhan mikroalga, namun pada tingkat konsentrasi nitrogen dan fosfor tertentu dapat membatasi pertumbuhan. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil bahwa pertumbuhan *Thalassiosira* sp. tertinggi pada rasio N:P 12:1 hingga 16:1

dengan rerata pertumbuhan $0,608 \pm 0,006$ hingga $0,623 \pm 0,011$ sel/hari. Nilai rasio N:P ini sesuai dengan rasio Redfield untuk rerata pertumbuhan fitoplankton yaitu 16:1.

Pertumbuhan *Thalassiosira* sp. bisa diketahui dari waktu *lag phase*, laju pertumbuhan sel, kepadatan sel tertinggi dan kepadatan sel diakhir penelitian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio N:P berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap waktu *lag phase*, laju pertumbuhan sel, kepadatan sel tertinggi dan kepadatan sel diakhir dari *Thalassiosira* sp. Rasio N:P berpengaruh secara linier terhadap laju pertumbuhan. Hasil waktu *lag phase* dari nilai tertinggi ke terendah berturut-turut yaitu perlakuan E $-1,483 \pm 0,025^d$ hari, perlakuan D $-1,521 \pm 0,020^{cd}$ hari, perlakuan C $-1,559 \pm 0,046^{bc}$ hari, perlakuan B $1,610 \pm 0,024^b$ hari dan perlakuan A $-1,773 \pm 0,067^a$ hari. Nilai negatif menunjukkan bahwa waktu *lag phase* diduga terjadi bukan pada kultur yang sesungguhnya, melainkan *lag phase* terjadi saat kondisi kultur sel sebagai inokulan. Suminto dan Hirayama (1996), bahwa waktu *lag phase* pada kultur *Chaetoceros gracilis* dengan bakteri *Micrococcus* DN-11 dan kultur *Chaetoceros gracilis* pada kontrol dengan penambahan ZoBell 2216E menghasilkan nilai -1,6 dan -0,8 hari. Tidak adanya fase lag dalam kultur dapat disebabkan oleh kondisi dari inokulan yang digunakan. Menurut Spencer (1954) dalam Ajithkumar *et al.* (2019), fase lag dipengaruhi kuat oleh kondisi inokulan. Sel inokulan yang dipindahkan ke media baru dengan kondisi pertumbuhan yang sama seperti cahaya, suhu dan salinitas tidak mungkin memiliki fase lag. Nilai *lag phase* perlakuan A hingga perlakuan E menghasilkan nilai yang semakin meningkat. Semakin meningkatnya nilai *lag phase* menunjukkan bahwa masa adaptasi sel diatom terhadap media kultur berlangsung semakin cepat sehingga akan menghasilkan nilai laju pertumbuhan yang semakin besar karena sel memanfaatkan nutrisi secara optimal.

Nilai laju pertumbuhan menunjukkan bahwa sel telah masuk fase eksponensial. Laju pertumbuhan sel tertinggi pada penelitian terjadi pada perlakuan perlakuan D dan perlakuan E dengan nilai $0,608 \pm 0,006$ hingga $0,623 \pm 0,011$ sel/hari, sementara laju pertumbuhan terkecil pada perlakuan A $0,522 \pm 0,022$ sel/hari. Perlakuan A memiliki nilai laju pertumbuhan terkecil dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan rasio N:P 0:0 yang artinya tidak ada penambahan N dan P ke dalam media kultur, sel hanya memanfaatkan N dan P yang terkandung pada air laut untuk tumbuh sehingga menghasilkan laju pertumbuhan yang kecil. Menurut Sisi *et al.* (2010), jika konsentrasi nitrogen dan fosfor sangat kecil pada media kultur tidak dapat mendukung pertumbuhan biomassa fitoplankton yang tinggi. Serupa dari penelitian dari Yang *et al.* (2014), bahwa lima spesies *benthic diatom* tidak dapat tumbuh tanpa adanya penambahan nitrogen dan fosfor ke dalam media kultur. Hasil laju pertumbuhan dari perlakuan B $0,574 \pm 0,010$ sel/hari dengan rasio N:P=4:1 hingga Perlakuan E $0,623 \pm 0,011$ sel/hari dengan rasio N:P=16:1 menunjukkan nilai laju pertumbuhan yang meningkat seiring meningkatnya rasio N:P yang diberikan. Hal ini diduga bahwa kebutuhan rasio N:P untuk pertumbuhan *Thalassiosira* sp. mendekati rasio yang optimum. Menurut Qingtian dan Guikum (2011), bahwa secara umum kondisi optimal rasio N:P untuk pertumbuhan mikroalga berkisar 16:1 hingga 30:1.

Nilai laju pertumbuhan yang diperoleh memiliki nilai yang kecil. Kultur *Thalassiosira* sp. ditemukan banyak kontaminan yang belum teridentifikasi, namun terdapat kontaminan yang berhasil diketahui yaitu *Euglena* sp. dan *Chlamydomonas* sp. Kondisi selama kultur *Thalassiosira* sp. ini belum *axenic* (bebas dari kontaminan). Hal ini diduga menjadi penyebab kurang maksimalnya kepadatan sel *Thalassiosira* sp. Keberadaan kontaminan memberikan dampak negatif dalam pertumbuhan diatom. Dijelaskan dalam penelitian bahwa kontaminan bakteri mendominasi dalam kultur masal dan telah merusak sel diatom (Suminto dan Hirayama, 1996). Bakteri dan protozoa umumnya hidup disekitar dinding sel dan menyebabkan degradasi dinding sel mikroalga (Noerdjito, 2019).

Puncak kepadatan merupakan tanda bahwa pertumbuhan telah masuk fase stasioner. Fase stasioner ditandai dengan seimbangnya laju pertumbuhan dan kematian. Puncak kepadatan sel tertinggi pada perlakuan D dan perlakuan E $1,6 \times 10^5$ sel/ml hingga $1,7 \times 10^5$ sel/ml dan terendah pada perlakuan A $1,1 \times 10^5$ sel/ml. Puncak kepadatan sel pada perlakuan A hingga perlakuan E meningkat seiring dengan meningkatnya rasio N:P dari 0:0 hingga 16:1. Hasil serupa pada penelitian Liu (2012), bahwa adanya penambahan konsentrasi N dan P dalam media kultur mengakibatkan peningkatan kepadatan sel maksimum pada *Skeletonema* sp. Puncak kepadatan sel untuk semua perlakuan terjadi pada kultur hari ke 2. Fase stasioner pada penelitian ini terjadi selama 1 hari kultur. Puncak kepadatan sel yang terjadi secara singkat ini diduga karena kondisi media kultur yang terdapat kontaminan sehingga terjadi persaingan dalam memanfaatkan nutrisi dan ruang. Menurut Suminto dan Hirayama, (1996), bahwa jumlah kepadatan bakteri (kontaminan) akan mempengaruhi pertumbuhan dan jumlah dari sel diatom

Penurunan kepadatan sel ditandai dengan laju kematian lebih cepat ini merupakan fase kematian (Putra *et al.*, 2015). Fase kematian terjadi pada semua perlakuan setelah adanya puncak kepadatan sel. Hasil kepadatan sel akhir dari tertinggi ke terendah berturut-turut yaitu perlakuan E $6,7 \times 10^4$ sel/ml, perlakuan D $5,1 \times 10^4$ sel/ml, perlakuan C $5,0 \times 10^4$ log sel/m, perlakuan B $4,0 \times 10^4$ sel/ml dan perlakuan A $2,4 \times 10^4$ sel/ml. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi

rasio N:P maka semakin tinggi kepadatan sel akhir yang dihasilkan. Penurunan kepadatan sel pada fase kematian disebabkan oleh ketersediaan nutrisi pada media kultur yang semakin sedikit. Menurut Budiardi *et al.* (2010), kematian sel disebabkan oleh beberapa faktor yaitu nutrisi yang semakin berkurang, kualitas air yang menurun dan kontaminasi oleh mikroorganisme lain.

Kandungan protein *Thalassiosira* sp.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa kandungan protein pada setiap perlakuan memiliki hasil yang berbeda. Perlakuan A tanpa nitrogen dan fosfor memiliki kandungan protein sebesar 19,53% terendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Menurut Li *et al.* (2008), sumber karbon atau nitrogen memiliki pengaruh langsung terhadap produktivitas protein. Sumber nitrogen yang rendah menghasilkan penurunan sintesis protein. Perlakuan B rasio N:P 4:1 memiliki kandungan protein 42,11% tertinggi. Hasil protein perlakuan C, perlakuan D dan perlakuan E berturut-turut yaitu 35,95%, 40,35% dan 39,70%. Menurut Vega *et al.* (2004), hasil uji proksimat dari *Thalassiosira* sp. dalam keadaan kontrol mengandung protein sebesar $28 \pm 3,3\%$. Hasil tersebut menjelaskan bahwa nilai protein pada perlakuan A memiliki nilai yang rendah dibanding dengan penelitian yang ada, sementara untuk perlakuan B, C, D dan E memiliki nilai kandungan protein yang lebih tinggi. Perbedaan kandungan protein dalam sel diatom ini tidak dipengaruhi oleh P melainkan N. Menurut Liang *et al.* (2013), bahwa ketika konsentrasi fosfor menurun, kandungan protein tidak berubah secara signifikan, sedangkan kandungan karbohidrat mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa fosfor tidak mempengaruhi kandungan protein diatom. Adanya kontaminasi juga berpengaruh pada nutrisi sel *Thalassiosira* sp. Menurut penelitian bahwa kontaminasi menyebabkan kerusakan pada sel fitoplankton sehingga pada akhirnya menyebabkan penurunan nilai nutrisi dari fitoplankton (Suminto dan Hirayama, 1996).

Kualitas air dan intensitas cahaya kultur *Thalassiosira* sp.

Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air selama penelitian didapatkan nilai pH berkisar 7,9-9,6. Air laut memiliki pH 7,5. Media walne ditambahkan ke wadah kultur menyebabkan pH meningkat pada semua perlakuan. Menurut Hansen (2002), bahwa pH tinggi biasanya terjadi setelah adanya penambahan nutrisi pada laboratorium budidaya fitoplankton. Penelitian Elzenga (2001), menyebutkan pada genus *Thalassiosira* dengan spesies berbeda *T. pseudonana* dan *T. punctigera* tumbuh pada nilai pH berturut-turut 8,90 dan 9,77. Kondisi pH pada penelitian ini masih sesuai dengan pH untuk pertumbuhan *Thalassiosira* sp. Faktor lain yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga adalah intensitas cahaya. Intensitas cahaya yang digunakan dalam kultur sebesar 7500 lux yang berasal dari *tube lamp* 36 watt. Menurut Simianoto (2013), bahwa alga tumbuh pada intensitas cahaya berkisar 15-150 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{S}^{-1}$ atau setara dengan 1000-10000 lux. Cahaya menyediakan energi untuk proses fotosintesis dan metabolisme yang berpengaruh pada pertumbuhan terutama biomassa sel. Menurut Maynardo *et al.* (2015), bahwa intensitas cahaya yang tinggi dapat merusak sel dan menghasilkan pertumbuhan yang menurun. Intensitas cahaya tinggi menghasilkan panas yang berlebihan yang akan merusak sel mikroalga. Intensitas cahaya yang digunakan dalam penelitian masih dalam kesesuaian untuk mikroalga hidup. Suhu air dengan rentang nilai 25,1-26,9°C selama penelitian masih sesuai untuk pertumbuhan *Thalassiosira* sp. Menurut Boyd *et al.* (2013), diatom *Thalassiosira rotula* and *Thalassiosira pseudonana* dapat tumbuh pada rentang suhu dari 4-35°C. Hasil pengukuran kualitas air berupa salinitas selama penelitian yaitu 30-34 ppt. Salinitas untuk mikroalga laut tumbuh pada rentang 12-40 ppt (FAO, 1996). Kenaikan nilai salinitas terjadi diduga adanya penambahan media walne dan terjadi penguapan selama masa kultur. Hal ini diperkuat oleh Rafaelina *et al.*, (2016), kenaikan salinitas kultur ini dapat terjadi karena adanya pengendapan garam dalam medium. Konsentrasi garam dalam medium meningkat akibat penguapan air laut oleh panas yang berasal dari lampu dan cahaya matahari.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perbedaan rasio N:P berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap pola pertumbuhan yang meliputi waktu *lag phase*, laju pertumbuhan spesifik, kepadatan sel maksimum dan kepadatan sel akhir *Thalassiosira* sp. Perbedaan rasio N:P menghasilkan perbedaan kandungan protein dalam sel *Thalassiosira* sp.
2. Rasio 12:1 dan 16:1 menghasilkan pola pertumbuhan terbaik dengan nilai waktu *lag phase*, laju pertumbuhan, kepadatan sel maksimum dan kepadatan sel akhir berturut-turut yaitu $-1,756 \pm 0,048^{cd}$ hingga $-1,712 \pm 0,041^d$ hari; $0,610 \pm 0,006^{cd}$ hingga $0,623 \pm 0,011^d$ hari; $5,215 \pm 0,012^{cd}$ hingga $5,247 \pm 0,022^d$ log sel/ml dan $4,700 \pm 0,048^{cd}$

hingga $4,805 \pm 0,032^d$ log sel/ml. Rasio 4:1 menghasilkan nilai kandungan protein tertinggi sebesar 42,11 %.

Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini adalah rasio N:P=16:1 pada media kultur perlu ditingkatkan kembali karena melihat hasil data pola pertumbuhan menunjukkan kecenderungan yang masih terus meningkat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajithkumar, P. B., S. Joseph and K. Vidya. 2019. Growth Pattern of Stock Cultures of Five Selected Species of Marine Microalgae Maintained Under Indoor Controlled Environment and Under Outdoor Conditions. *Indian J. Fish*, 66(1):131-137.
- Andersen R. 2004. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academia Press, 578 pp.
- Boyd, P. W., T. A. Ryneerson, E. A. Armstrong, F. Fu, K. Hayashi, Z. Hu, D. A. Hutchins, R. M. Kudela, E. Litchman, M. R. Mulholland, U. Passow, R. F. Strzepek, K. A. Whittaker, E. Yu and M. K. Thomas. 2013. Marine Phytoplankton Temperature versus Growth Responses from Polar to Tropical Waters – Outcome of a Scientific Community-Wide Study. *PLOS ONE*, 8:1-17.
- Budiardi, T., N. B. P. Utomo and A. Santosa. 2010. Pertumbuhan dan Kandungan Nutrisi *Spirulina* sp. pada Fotoperiode yang Berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 9(2):146-156.
- Dyhrman, S. T. 2016. Nutrients and Their Acquisition: Phosphorus Physiology in Microalgae. *The Physiology of Microalgae*, 155-183 pp.
- Emmerson, W. D. 1980. Ingestion, Growth and Development of *Penaeus Indicus* Larvae as A Function of *Thalassiosira Weissflogii* Cell Concentration. *Marine Biology*, 58:65-73.
- Elzenga, J. T. M., H. B. A. Prins and J. Stefels. 2001. The Role of Extracellular Carbonic Anhydrase Activity in Inorganic Carbon Utilization of *Phaeocystis Globosa* (Prymnesiophyceae): A Comparison with Other Marine Algae Using the Isotopic Disequilibrium Technique. *Limnology Oceanography*, 45(2):372–380.
- FAO. 1996. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, 42 pp.
- Fogg, G. E. 1965. *Algae Culture and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin Press. Madison, Milk Wauhe.
- Hansen, P. J., 2002. Effect of High pH on The Growth and Survival of Marine Phytoplankton: Implications for Species Succession. *Aquatic Microbial Ecology*, 28:279-288.
- Isnansetyo, A dan Kurniastuti, 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton Pakan Alami Untuk Pembenihan Organisme Laut*. Kanisius. Yogyakarta.
- Klausmeier, C. A., E. Litchman, T. Daufresne and S. A. Levin. 2004. Optimal Nitrogen to Phosphorus Stoichiometry of Phytoplankton. *Nature*, 429:171-177.
- Liang, K., K. H. Zhang M. Guand W. Cong. 2013. Effect of Phosphorus on Lipid Accumulation in Freshwater Microalga *Chlorella* sp. *Journal Application of Phycology*, 25:311-318.
- Li, Y. U., M. Horsman, B. Wang, N. Wu and C. Q. Lan. 2008. Effects of Nitrogen Sources on Cell Growth and Lipid Accumulation of Green Alga *Neochloris oleoabundans*. *Application Microbiology Biotechnology*, 81:629-636.
- Liu, Y., X. Song, X. Cao and Z. Yu. 2012. Responses of Photosynthetic Characters of *Skeletonema costatum* to Different Nutrient Conditions. *Journal of Plankton Research*, 35(1):1-12.
- Mansour, M. P., D. M. F. Frampton, P. D. Nichols, J. K. Volkman and S. I. Blackburn. 2005. Lipid and Fatty Acid Yield of Nine Stationary-Phase Microalgae: Applications and Unusual C24–C28 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Applied Phycology*, 17:287-300.
- Marchetti, J., G. Bougaran, L. Le Dean, C. Mégard, E. Lukomska, R. Kaas, E. Olivo, R. Baron, R. Robert and J.P. Cadoret. 2012. Optimizing Conditions for The Continuous Culture of *Isochrysis affinis galbana* Relevant to Commercial Hatcheries. *Aquaculture*, 326-329:106-115.
- Ma'rufatin, A. 2016. Pengaruh Pemanenan Mikroalga (*Chlorella* sp.) secara Kontinyu terhadap Pertumbuhannya Di dalam Fotobioreaktor. *E-jurnal BPPT*, 9(1):19-30.
- Maynardo, J. J., V. Doshi, J. R. Rajanren and R. Rajasekaran. 2015. The Optimization of Light Intensity and Drying Temperature on Lipid Content of Microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Engineering Science and Technology Eureka*, 1;112-121.
- Noerdjito, D. R. 2019. Interaksi Mikroalga-Bakteri dan Peranannya dalam Produksi Senyawa alam Kultur Mikroalga. *Oseana*, 44(2):25-34.
- Nugroho, S. H. 2019. Karakteristik Umum Diatom dan Aplikasinya pada Bidang Geosains. *Oseana*, 44(1):70-87.
- Nurfalaa, E. Rosyida dan Z. R. Ya'la. 2016. Pengaruh Fotoperiod terhadap Kepadatan *Skeletonema costatum* Skala Laboratorium. *Jurnal Agrisains*, 17(3):153-159.
- Panjaitan, A. S., W. Hadie dan S. Harijati. 2015. Penggunaan *Chaetoceros Calcitrans*, *Thalassiosira Weissflogii* dan Kombinasinya pada Pemeliharaan Larva Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931). *E-jurnal Biologi LIPI*, 14(3):235-240.

- Putra, I. K. R. W., A. A. M. D. Anggreni dan I. W. Arnata. 2015. Pengaruh Jenis Media terhadap Konsentrasi Biomassa dan Klorofil Mikroalga *Tetraselmis chuii*. Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri, 3(2):40-46.
- Qingtian, Z. and H. Guikum. 2011. Effect of Nitrogen to Phosphorus Ratios on Cell Proliferation in Marine Micro Algae. Chinese Journal of Oceanology and Lymnology. 27(4):740-734.
- Rafaelina, M., Y. Rustam dan S. Amini. 2016. Pertumbuhan dan Aktivitas Antioksidan dari Mikroalga *Porphyridium cruentum* dan *Chlorella* sp. Bioma, 12(1):12-21.
- Rasdi, N. W. And J. G. Qin. 2014. Effect of N:P Ratio on Growth and Chemical Composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. J. Appl Phycol. 1-10.
- Risamasu, F. J. L. dan H. B. Prayitno. 2011. Kajian Zat Hara Fosfat, Nitrit, Nitrat dan Silikat di Perairan Kepulauan Matasiri, Kalimantan Selatan. Ilmu Kelautan. 16(3):135-142.
- Razaghi, A., A. Godhe and E. Albers. 2014. Effects of Nitrogen on Growth and Carbohydrate Formation in *Porphyridium cruentum*. Central European Journal of Biology, 9(2):156-162.
- Simionato, D., S. Basso, G. M. Giacometti and T. Morosinotto. 2013. Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. Biophysical Chemistry, 1-8.
- Sisi, X., S. Jinming, L. Xuegang, Y. Huamao, L. Ning, D. Liqin and S Peiyan. 2010. Changes in Nitrogen and Phosphorus and Their Effects on Phytoplankton in The Bohai Sea. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 28(4):945-952.
- Sugiyono. 2011. Metode Penelitian Administratif. Bandung: Alfabeta, 389 hlmn.
- Suminto. 2005. Budidaya Pakan Alami dan Rotifer. UPT-Pustaka Universitas Diponegoro, 77 hlmn.
- Suminto and K. Hirayama. 1996. Effects of Bacterial Coexistence on the Growth of a Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*. Fisheries Science, 62(1):40-43.
- Trikuti, I. K., A. A. M. D. Anggreni dan I. B. W. Gunam. 2016. Pengaruh Jenis Media terhadap Konsentrasi Biomassa dan Kandungan Protein Mikroalga *Chaetoceros calcitrans*. Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri, 4(2):13-22.
- Widianingsih, R Hartati, H. Endrawati and J. Mamuaja. 2013. Fatty Acid Composition of Marine Microalgae In Indonesia, 10:75-82.
- Yang, M., W. Zhao and X. Xie. Effects of Nitrogen, Phosphorus, Iron and Silicon on Growth of Five Species of Marine Benthic Diatoms. Acta Ecologica Sinice, 34:311-319.